

אפיון משק המים של פסילת האגס והמנגנונים המעורבים בתהליך

הפרשת טל הדבש

Water balance in the pear *Psylla* and mechanisms involved in the process of
honeydew production

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת מו"פ מטעים

ע"י

חיים ראובני¹, אפרים כהן² ושלהבת בלנק¹

¹ המרכז להדברה משולבת, מו"פ צפון.

² המחלקה לאנטומולוגיה, הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה.

Haim Reuveny, Integrated Pest Management Center, Northern R&D. P.O.B. 831,
Kiryat Shmona 11016. Email: haimr@yiron.org.il

Ephraim Cohen, Department of Entomology, Faculty of Agricultural, Food and
Environmental Quality Sciences, the Hebrew University of Jerusalem, Rehovot
76100. Email: ecohen@agri.huji.ac.il

Shalhevet Blanc, Integrated Pest Management Center, Northern R&D. P.O.B. 831,
Kiryat Shmona 11016. Email: shalhevetb@gmail.com

אפריל 2008

ניסן תשס"ח

תקציר

הצגת הבעיה ומטרות

פסילת האגס גורמת לנזק בפירות כתוצאה מהפרשה של טל דבש ויעילות התכשירים להדברתה מוגבלת. מטרות המחקר העיקריות היו לבסס גידול של המזיק על הצמח הפונדקאי, לפתח שיטות למדידה כמותית של טל הדבש ולאפיין האנזים α -glucosidase.

מהלך הניסויים ושיטות עבודה

הוקמה תשתית לגידול הפסילה על הצמח הפונדקאי בתנאים מבוקרים. בוגרים שנאספו בשדה הועברו לאכלוס שתילים של אגס. הנימפות של הדור הראשון הוזנו על עלים בודדים ונערכו ניסויים למדידה כמותית של טיפות טל הדבש במרווחי זמן ידועים. בנוסף, איפיון האנזים α -glucosidase בוצע עם בוגרי הפסילה.

תוצאות עיקריות

פותחה שיטה יעילה למדידה כמותית של טל הדבש בעזרת צילום דיגיטלי ומדידת שטח הטיפה במערכת ממוחשבת לעיבוד תמונות. בנוסף, נקבעה שיטה להכנת ההומוגנט של הבוגרים לקבלת פעילות אופטימלית של האנזים ואפיונו.

מסקנות והמלצות

כדי לקבל ולתחזק גידול יציב רב-שנתי של פסילת האגס יש צורך ללמוד כיצד לווסת את אוכלוסייתה על הצמח הפונדקאי. צריך גם לשפר את טכניקות הצילום של טל הדבש כדי שניתן יהיה לתרגם את התמונה למדדי נפח במקום שטח.

מבוא

פסילת האגס *Cacopsylla bidens* (Sulc) היא מזיק מפתח במטעי האגס בארץ. דרגות הנימפה מפרישות כמויות גדולות של טל-דבש עליו מתפתחת פייחת המכערת את הפירות ומפחיתה מערכם המסחרי. יעילות הדברת המזיק עם תכשירים כימיים מוגבלת ואין בה כדי למנוע לגמרי את הנזק המצטבר כתוצאה מטל הדבש על הפירות. הפרשת זו היא אחד הפתרונות של חרקים מוצצים כדי להיפטר מהעקה האוסמוטית הנגרמת כתוצאה ממציצת מוהל הפלואם בעלים שבו יש ריכוז גבוה ביותר של הדיסקריד סוכרוז. במחקר הנוכחי נבדקת האפשרות להשפיע על הפרשת טל הדבש על ידי עיכוב המערכת האנזימטית המעורבת בהפרשה זו.

מטרות המחקר לתקופת הדו"ח

1. ביסוס גידול מעבדה של פסילת האגס כדי לקבל כמות זמינה של פרטים למחקר בכל חודשי השנה.
2. פיתוח שיטה למדידה כמותית של טל הדבש.
3. פיתוח שיטות ואיפיון האנזים α -glucosidase.

פרוט הניסויים

א. ביסוס גידול מבוקר של פסילת האגס על הצמח הפונדקאי

כדי לטפח גידול של הפסילה על הצמח הפונדקאי נאספו בוגרים ממוטע מסחרי שהועברו לעצי אגס צעירים המוחזקים בחדר מבוקר וסגור החשוף לתאורת שמש טבעית. כדי למנוע אכלוס מופרז של הפסילה על העץ הוסרו חלק מהעלים שעליהם התפתחו נימפות. חלקן הועבר למערך הניסויים למדידה כמותית של טל הדבש והנותר הושמד. כך ניתן היה לווסת את רמת האוכלוסייה המתפתחת על הצמח הפונדקאי. בנוסף, הוקם מערך גידול של הפסילה על שתילוני אגס שהוחזקו בכלובים נפרדים בתוך חדר הגידול. בשיטה זאת ניתן היה לעקוב אחר התפתחותה של נימפה אחת על עלה בודד. במערכת זאת ניתן היה לעקוב אחר התפתחותם של פרטים בודדים בגיל ידוע ולתעד את כמות טל הדבש שהפרישו במרווחי זמן ידועים.

ב. פיתוח שיטה למדידה כמותית של טל הדבש

כדי למדוד את כמות טל הדבש המופרשת על ידי פסילת האגס הוחזקו נימפות בגיל ידוע על שתילוני אגס זעירים. על כל עלה התפתחה נימפה אחת ונערך מעקב אחר הפרשת טל הדבש במרווחי זמן ידועים. נבדקו שתי שיטות למדידה כמותית: האחת, על ידי שאיבת טל הדבש לטיפ אפנדורף בעזרת אספירטור, והשנייה על ידי ניתוח גודל הטיפה בצילום דיגיטלי בעזרת התוכנה Image-Pro.

ג. הכנת ההומוגנט ואיפיון האנזים α -glucosidase

בופר הריסוק בו השתמשנו מכיל potassium phosphate (50mM, pH 6.8) ו- Triton 0.5% X-100. יחס חרק/בופר היה 500 בוגרי פסילה ל- 1 מ"ל. לאחר פעולת הריסוק ההומוגנט סורכו במהירות של 11,000 rpm למשך 20 דקות והנוזל העליון שהתקבל סורכו פעם נוספת למשך 5 דקות באותה מהירות סירכו. הנוזל העליון שהתקבל לאחר פעולה זו שימש כמקור לאנזים. הריאקציות האנזימטיות בוצעו בפלטות פלסטיק עם 96 בארות בנפח סופי של 200 מיקרוליטרים בכל באר. לכל באר הוספו 50 מיקרוליטרים של האנזים ו-50 מיקרוליטרים של בופר פוספאט ללא הדטרגנט Triton X-100. לאחר תקופת אינקובציה של 4 דקות בטמפרטורה של 30 מ"צ הוספו 100 מיקרוליטרים של הסובסטרט (p-nitrophenyl- α -glucoside) המומס בבופר פוספאט בריכוז סופי של 5mM. הריאקציה האנזימטית נמשכה 5 דקות ב-30 מ"צ ועוצמת הצבע שהתפתח נקראה באורך גל של 405nm במכשיר Thermomax Microplate Reader. רמת החלבון נקבעה באופן קולורימטרי לפי שיטת Bradford. כדי לקבל פעילות מירבית של האנזים הוסף פחם פעיל להומוגנט לאחר פעולת הסירכו. כמו כן, השתמשנו בריכוזים שונים של הדטרגנט Triton X-100 ושל המלח KCl.

תוצאות

א. ביסוס גידול מבוקר של פסילת האגס על הצמח הפונדקאי

ביסוס אוכלוסיית הפסילה על עצי אגס מבוגרים שנאספו בחדר מבוקר היה מוצלח. הבעיות העיקריות היו בוויסות האוכלוסייה שלא תגרום נזק לצמח הפונדקאי ובמניעת אילוח של מזיקים אחרים (כגון; עשי מנהרות, כנימות עלה ואקריות). השיטה היעילה לוויסות אוכלוסיית

הפסילה והקטנת האוכלוסיות של יתר המזיקים, למעט נגיעות באקריות, הייתה על ידי דילול עלים נגועים. עד כה לא נמצא פתרון מוצלח שיגרום להגבלת אוכלוסיית האקריות, שנוכחותן השפיעה לרעה על התפתחות עצי האגס.

ב. קביעה כמותית של טל הדבש

בשאיבה של טל הדבש לטיפ אפנדורף בעזרת אספירטור התקבל מקטע לא רציף בחלק מהמקרים, והיה קושי לקבוע את נפח הדוגמא שנשאבה. הסיבה העיקרית לכך הייתה צמיגות הדוגמא שהרכבה העיקרי כלל גם את הסוכרים המופרשים על ידי נימפות הפסילה וגם חומר המכונה Jerp שהרכבו עמילני (ראה נספח תוצאות, תמונה 1). בנוסף, היו מקרים שפעולת השאיבה גרמה לנימפה לזוז ממקומה ולהתיישב במקום חדש על העלה, תזוזה שאותה היה רצוי למנוע. בשיטת המדידה בעזרת צילום של טיפות טל הדבש ועיבוד עם תוכנת Image Pro התקבלו נתונים שהתייחסו לשטח הטיפה והיקפה בלבד. יש צורך לשפר את זוויות הצילום כך שניתן יהיה לקבל את מימד העומק ולחשב את נפח הטיפה. באופן כללי, את שתי שיטות המדידה שלעיל, המתייחסות לקביעה כמותית של טל הדבש המופרש מנימפות הפסילה, צריך לשפר, ובהתאם לקבוע את השיטה הנוחה, היעילה והמדויקת ביותר למדידה.

ג. אפיון האנזים α -glucosidase

ההומוגנט שהתקבל לאחר ריסוק הפסילות הבוגרות בבופר פוספאט ללא דטרגנט לא אפשר קריאה אנזימטית מהימנה מאחר וגם לאחר סינון הוא היה עכור כתוצאה מנוכחותם של ליפידים שמקורם, כפי הנראה, בגוף השומן של החרק. לפיכך, הוספנו לבופר הפוספאט את הדטרגנט Triton X-100 בריכוזים החל ב-0.25% ועד ל-2%. כמו כן הוספנו לבופר, ללא נוכחות הדטרגנט, KCl בריכוזים שונים.

בתנאים אלו נמצא כי פעילות האנזים α -glucosidase בפסילת האגס ניתנת לכימות והיא בסדר גודל של בין 700-800mOD לדקת ריאקציה בשלב הלינארי למ"ג חלבון. הוספת הדטרגנט Triton X-100 לבופר ההומוגנציה ברכוז של 0.5% v/v שיפרה את הפעילות האנזימטית, אך רמה גבוהה יותר גרמה לפעילות נמוכה באופן משמעותי. רמות גבוהות של אשלגן כלורי (1%-2%) גרמו אף הן לירידה בפעילות האנזים. ריכוז מלח נמוך יותר היה היעיל ביותר (ראה נספח תוצאות, תמונה 2).

כדי להתגבר על התופעה של עכירות ההומוגנט הוסף פחם פעיל אך, טיפול זה לא שיפר את פעילות האנזים ואף עיכב אותו באופן ניכר (ראה נספח תוצאות, תמונה 3D). המערכת האנזימטית נבדקה לאפשרות העיכוב על ידי מעכבים תחרותיים מהדגם של DNJ, מולקולה בה החמצן בטבעת הגלוקוז הותמר באטום החנקן. נמצא כי DNJ הוא מעכב חזק ביותר וכבר בריכוז של 10 μ M פעילות האנזים מעוכבת בלמעלה מ-50%, וברמה נמוכה של 2 μ M פעילות האנזים מעוכבת לחלוטין (ראה נספח תוצאות, תמונה 3).

דין

מטרות המחקר העיקריות היו לבסס גידול של פסילת האגס על הצמח הפונדקאי כדי שישמש כמקור לניסויים השונים ולפתח שיטות למדידה כמותית של טל הדבש ולאייפיון האנזים α -glucosidase. שיטת גידול הפסילה על עצי האגס בתנאים מבוקרים הייתה מוצלחת, למעט ההתמודדות עם מזיקי עלווה אחרים ובעיקר אקריות ועשי מנהרות. כדי לפתור בעיה זאת נדרש טיפול יומי הכרוך בסילוק ידני של עלים נגועים במזיקים שונים ובוויסות אוכלוסיית הפסילה. כמו כן, יש צורך בהכנסה תקופתית של צמחים חדשים שאינם מאוכלסים בפסילה כדי לשמור על יציבות הגידול. דבר זה נוח היה לבצע עם שתילוני אגס זעירים שאחזקתם פשוטה יחסית. בעזרתם ניתן גם היה לבדוד נימפות בגיל ידוע שהתפתחו על עלים נפרדים לצורך המעקב אחר הפרשת טל הדבש. ברוב המקרים, נימפות בדרגה ראשונה התיישבו על העלים ולא שינו מיקומן עד שלב המעבר לדרגה שנייה. כך, נוח היה לאסוף או לצלם את כמות טל הדבש שהופרשה במרווחים של 24 שעות מבלי שהנימפה זזה ממקומה. הבעיה העיקרית הייתה בקביעת שיטה יעילה לקבלת נפח ההפרשה, ונראה שניתן לשפר זאת על ידי צילום דיגיטלי בזוויות מתאימות שיאפשרו למדוד את עומק הטיפה.

אייפיון האנזים α -glucosidase בפסילת האגס הוא תנאי מוקדם על מנת לקבוע את עיכוב הפעילות באמצעות אימינוסוכרים. מולקולות אלה נקשרות לאתר הפעיל של האנזים ובכך מונעות את פירוק הסוכרוז שבפלוואם האגס ממנו ניזון החרק. פעילות זו גם מונעת את ייצורם של אוליגוסכרידים לצורך הפיסיולוגי של משק מים והפרשת טל דבש תקינים. בתחילת הדרך נתקלנו בבעיה של עכירות ההומוגנט שהתקבל לאחר ריסוק החרקים בבופר המתאים. עכירות זו הקשתה על מדידה מהימנה של פעילות האנזים. הוספה של פחם פעיל כדי לספוג את גורם העכירות לא שיפר את פעילות האנזים ואף גרם לעיכוב מסוים. הוספה של הדטרגנט Triton X-100 לבופר ההומוגנציה בשיעור של 0.5% שיפר את התמונה. לדטרגנט זה גם חשיבות גם במיצוי של α -glucosidase הקשור לממברנות של תאי המעי. בניסויים הקדמיים הצלחנו להראות עיכוב על ידי DNJ בריכוז נמוך ביותר של $2\mu\text{M}$. מכאן פתוחה הדרך לביצוע ניסויי *in vitro* ו-*in vivo* עם מעכבים נוספים כדי לאמוד את פוטנציאל העיכוב האנזימטי שלהם, ובהמשך פגיעה יעילה במשק המים של הפסילה ובהפרשת הטל דבש. שיבוש משק המים והפרשת הטל דבש על ידי פגיעה במערכת האנזימטית של פרוק הסוכרוז, שהיא אתר מטרה ייחודי, יפתח את הדרך להדברה של פסילת האגס שפתחה עמידות כנגד מרבית תכשירי ההדברה.

תמונה 1. תאור טיפת טל דבש שהופרשה על ידי נימפה של פסילת האגס בדרגה שנייה.

מלבד טל הדבש, ניתן להבחין בשובל הלבן הנפרש בחלקה האחורי של הנימפה המכונה Ierp שהרכבו עמילני.



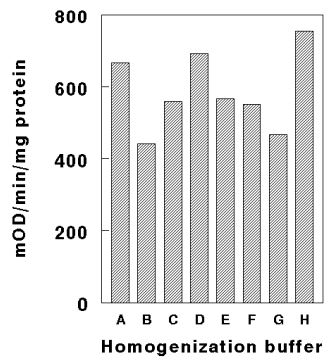
תמונה מס' 2. השפעת בופרים של הומוגניזציה על פעילות α -glucosidase של פסילת האגס.

A - בופר פוספאט

B-E - בופר פוספאט בתוספת Triton X-100 בריכוזים של 0.25%, 0.5%, 1%, 2% בהתאמה.

H-F - בופר פוספאט בתוספת KCl בריכוזים של 0.5%, 1%, 2% בהתאמה.

רמת החלבון ב-50 מיקרוליטרים של ההומוגנאט בריאקציה האנזימטית היה $25\mu\text{g}$. הפעילות האנזימטית של α -glucosidase מבוטאת כ-mOD/min/mg protein וחושבה על פי הפזה הלינארית של הריאקציה.



הפעילות הרציפה של α -

תמונה מס' 3. תרשים

glucosidase במשך 5 הדקות הראשונות של הריאקציה האנזימטית.

בופר ההומוגניזציה ב-A-F הכיל Triton X-100 בריכוז של 0.5%.

A - בקורת; B - נוכחות המעכב DNJ (N-deoxynojirimycin) בריכוז של $10\mu\text{M}$; C - $2\mu\text{M}$ DNJ; D - הומוגנאט + פחם פעיל; E - כמו D בתוספת $10\mu\text{M}$ DNJ; F - כמו D בתוספת $2\mu\text{M}$ DNJ.

